

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

07 APR 2005

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年4月15日 (15.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/030689 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 38/17, 45/00, A61P 9/00, 19/08, 25/00, 43/00, C12Q 1/02, G01N 33/50, 33/15

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012680

(22) 国際出願日: 2003年10月2日 (02.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-294071 2002年10月7日 (07.10.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立
行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND
TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉
県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 妹尾 昌治
(SENO, Masaharu) [JP/JP]; 〒703-8273 岡山県岡山市
門田文化町2-10-13 Okayama (JP). 黒田 俊
一 (KURODA, Shun'ichi) [JP/JP]; 〒565-0872 大阪府
吹田市上山田7-C-104 Osaka (JP). 谷澤 克行
(TANIZAWA, Katsuyuki) [JP/JP]; 〒563-0214 大阪府豊

能郡 豊能町希望ヶ丘2-30-2 Osaka (JP). 北添 翠
(KITAZOE, Midori) [JP/JP]; 〒700-0953 岡山県岡山市
西市4-2-4 ソレイユハルミ105号 Okayama
(JP). 岩田 美紀 (IWATA, Miki) [JP/JP]; 〒614-8373 京都
府八幡市男山八望2番地C-18-508 Kyoto (JP).
藤田 敏次 (FUJITA, Toshitsugu) [JP/JP]; 〒518-0842 三
重県上野市桑町1407番地の1 Mie (JP). 朴井 伸
行 (BOKUI, Nobuyuki) [JP/JP]; 〒621-0846 京都府亀
岡市南つじヶ丘大葉台2丁目6-7 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒107-0062
東京都港区南青山6丁目11番1号 スリーエフ南青山
ビルディング7F Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING EOSINOPHIL CATIONIC PROTEIN

(54) 発明の名称: 好酸球カチオン性タンパク質を含有する組成物

(57) Abstract: A therapeutic composition for diseases caused by failures in the survival, proliferation and/or differentiation of cells
which contains eosinophil cationic protein and other components; and a medium composition for promoting the survival, prolifera-
tion and/or differentiation of cells.

(57) 要約: 好酸球カチオン性タンパク質と他の成分とを含有し、細胞の生存維持、増殖および/または細胞分化の障
害を原因とする疾患に対する治療用組成物、および細胞の生存維持、増殖および/または細胞分化を促進する増地組
成物。

WO 2004/030689 A1

明細書

好酸球カチオン性タンパク質を含有する組成物

5

技術分野

この出願の発明は、好酸球カチオン性タンパク質を含有する組成物に関するものである。さらに詳しくは、この出願は、好酸球カチオン性タンパク質の新規生理活性を利用する治療用組成物と細胞培地組成物、並びに好酸球カチオン性タンパク質の生理活性を指標とするスクリーニング方法に関するものである。

10

背景技術

好酸球カチオン性タンパク質 (eosinophil cationic protein: 以下「ECP」と記載する) は、好酸球の活性化に伴って発現が上昇するタンパク質であり、塩基性顆粒中に存在する (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83(10): 3146-3150)。

この ECP は、寄生虫殺傷、神経毒、リンパ球増殖抑制、殺菌、ヒスタミン遊離、リボヌクレアーゼ、凝固時間短縮等の活性を有することが知られており (日本臨床 1993, 51(3): 60(606))、特にそのヒスタミン遊離活性はアレルギー反応を惹起することから、ECP の発現抑制を薬理作用とする抗アレルギー薬が提案されている (特表 2002-500506 号公報)。またこの ECP を含む好酸球細胞株を喘息薬や抗アレルギー薬のスクリーニングに利用することも提案されている (特開平 05-111382 号公報)。

15

20

前記のとおり、ECP の生理活性はこれまで、細菌や動物細胞に対する毒性や増殖抑制であると認識されてきた。

25

これに対し、この出願の発明者らは、ECP が動物細胞の生存維持や分化促進といった新規の生理活性を有することを見出した。

この出願の発明は、発明者らが見出した ECP の新規活性を利用した新しい組成物を提供することを課題としている。

また、この出願は、ECP の新規活性を指標として、細胞の生存維持や分化を促

進させることを薬理作用とする治療薬剤を開発するための新しい方法を提供することを課題としている。

発明の開示

- 5 この出願は、前記の課題を解決するための第1の発明として、細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化の障害を原因とする疾患に対する治療用組成物であって、好酸球カチオン性タンパク質と薬理学的成分とを含有することを特徴とする組成物を提供する。

- 10 この第1発明の組成物においては、細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化の障害を原因とする疾患が、心臓疾患、骨疾患または、神経変性疾患であることを好ましい態様としている。

またこの出願は、第2の発明として、細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化を促進する培地組成物であって、好酸球カチオン性タンパク質と細胞生物学的成分とを含有する組成物を提供する。

- 15 さらにこの出願は、第3の発明として、細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化の障害を原因とする疾患に対する治療用組成物の有効成分物質をスクリーニングする方法であって、細胞に候補物質を接触させ、好酸球カチオン性タンパク質と同程度またはそれ以上に細胞の生存維持および／または細胞分化を促進させる物質を目的物質として特定することを特徴とするスクリーニング方法を提供する。

20 この第3発明においては、細胞が、神経細胞、骨細胞、心筋細胞または線維芽細胞であることを好ましい態様としている。

- すなわち、この出願の発明者らは、従来は細胞毒性や細胞の増殖抑制を生理活性とするものと考えられてきた ECP について、以下のとおりの新たな活性を見出した。

- 25 (1) 線維芽細胞の増殖促進とストレスファイバーの形成促進。
(2) 心筋細胞の筋繊維の成熟と、拍動数の上昇。
(3) 低血清または無血清培地での神経細胞の生存率の向上。
(4) 骨芽細胞の分化促進。

そしてまた、前記の活性は、細胞のシグナル伝達経路において重要な役割を果たしている低分子量 G タンパク質 Rho キナーゼの基質 (ROCK) に対する阻害剤によって抑制もしくは消失することから、ECP が細胞のシグナル伝達経路に作用し、前記 (1) ~ (4) の活性をもたらすことを見出してもいる。

5

図面の簡単な説明

図 1 は、正常組織由来細胞株の増殖に対する ECP の効果を試験した結果である。黒丸は BALB/c 3T3 細胞、三角は A10 細胞、四角は HC-11 細胞、白丸は HUVEC 細胞である。

10 図 2 は、BALB/c 3T3 細胞の増殖に対する ECP の用量依存効果を試験した結果である。

図 3 は、BALB/c 3T3 の増殖に対する ECP の経時効果を試験した結果である。黒丸は EPC、黒四角は RNase、白四角はコントロールである。

15 図 4 は、低血清培地での BALB/c 3T3 増殖に対する ECP の効果を試験した結果 (位相差顕微鏡像) である。

図 5 は、低血清培地での BALB/c 3T3 細胞骨格分子形成に対する ECP 効果を試験した結果 (共焦点レーザー顕微鏡像) である。

図 6 は、低血清培地での BALB/c 3T3 細胞骨格分子形成に対する ECP+bFGF 効果を試験した結果 (共焦点レーザー顕微鏡像) である。

20 図 7 は、BALB/c 3T3 細胞の細胞骨格形成に対する ECP 効果と ROCK 阻害剤の効果を試験した結果 (共焦点レーザー顕微鏡像) である。

図 8 は、新生仔ラット由来の心筋細胞における細胞骨格形成に対する ECP 効果を試験した結果 (共焦点レーザー顕微鏡像) である。

25 図 9 は、新生仔ラット由来の心筋細胞の拍動数に対する ECP 効果を試験した結果である。

図 10 は、心筋細胞拍動数に対する ECP と ROCK 阻害剤の効果を試験した結果である。

図 11 は、無血清培養液における神経様 PC12 細胞の生存に対する ECP の効果を試験した結果である。カラムは、1 : ECP 添加前、2 : ECP 0 ng/ml、3 : ECP 10

ng/ml、4 : ECP 1000 ng/ml の平均値である。

図 1 2 は、ラット頭蓋冠骨由来の MC3T3-E1 細胞におけるアルカリフォスファターゼ活性に対する ECP 効果を試験した結果である。

5

発明を実施するための最良の形態

この出願の発明は、以上のとおりの新規な知見を基礎とするものである。以下、この出願の各発明について、実施形態を詳しく説明する。

この出願の各発明において使用する ECP は、ヒトをはじめとする各種哺乳動物の細胞（白血球や造血幹細胞）から公知の方法によって単離することができる。

10 また、そのアミノ酸発列（ヒト ECP : GenBank/X15161、チンパンジー : GenBank/AF294028、ゴリラ : GenBank/U24097）等に基づいて公知の固相ペプチド合成法により化学合成して作製することもできる。あるいは、それぞれのペプチドをコードするポリヌクレオチドを in vitro 転写翻訳系や適当な宿主-ベクター系で発現させることによって、組換え ECP として取得することができる。ポリ
15 ヌクレオチド（例えば ECP cDNA）は前記 GenBank データベースの塩基配列情報に基づき作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いて既存の cDNA ライブラリーをスクリーニングする方法や、オリゴヌクレオチドプライマーを用いた RT-PCR 法等の公知の方法により取得することができる。

例えば組換え ECP を in vitro 転写翻訳で作製する場合には、前記ポリヌクレ
20 オチドを、RNA ポリメラーゼプロモーターを有するベクターに挿入して発現ベクターを作製し、このベクターを、プロモーターに対応する RNA ポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加する。RNA ポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6 などが例示できる。これらの RNA ポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、
25 pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript II などが例示できる。

組換え ECP を、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNA クローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに前記の DNA 断片を組換えた発現ベクターを作成し、培養物から融合ペプチドを単離する。大腸菌用発現ベクターとしては、

pUC 系、pBluescript II、pET 発現システム、pGEX 発現システムなどが例示できる。

また組換え ECP を真核細胞で発現させる場合には、前記の融合ポリヌクレオチドを、プロモーター、スプライシング領域、ポリ (A) 付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作成し、真核細胞内に導入すれば融合ペプチドを形質転換真核細胞で発現させることができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBV ベクター、pRS、pcDNA3、pMSG、pYES2 などが例示できる。真核細胞としては、サル腎臓細胞 COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO などの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、目的とするタンパク質を発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。

発現ベクターを宿主細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAE デキストラン法など公知の方法を用いることができる。

融合ペプチドを原核細胞や真核細胞で発現させたのち、培養物から組換え ECP を単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせで行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

なお、ECP は分泌性タンパク質であり、例えばヒト ECP の場合にはその N 端側の 23 アミノ酸配列が分泌シグナルである。従って、原核細胞や真核細胞で組換え ECP を発現させる場合には、その培養物からの組換え ECP の回収効率を考慮して、分泌シグナル配列より C 端側（例えば第 28 位 Arg 以降）の活性領域を発現させることが好ましい。

第 1 発明の組成物は、前記のとおり ECP と薬理学的成分とを含有することを特徴とする医療用組成物であり、細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化の障害を原因とするヒト疾患の治療に用いられる。すなわち、このような疾患は生体の各種組織細胞の正常なライフサイクル（増殖、分化、細胞死等）の異常によって発症する疾患であり、遺伝や様々な細胞障害物質を原因とする各種の疾患

を対象とすることができる。特に、心臓疾患、骨疾患および神経変性疾患の完治、寛解または症状の改善に使用することができる。心臓疾患としては、心筋の細胞骨格の形成以上や変性等を原因とする心筋梗塞、心筋炎、心筋症（拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、内腔閉鎖型心筋症等）、心筋線維症などである。骨疾患としては、特に造骨細胞（骨芽細胞）の分化障害を原因とする骨粗鬆症や歯周病である。またこの治療用組成物は骨折後の骨組織再生のためにも使用することができる。神経変性疾患としては、神経細胞の変性や細胞死を原因とするアルツハイマー病、老年性痴呆、ダウン症、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、筋萎縮性脊髄側索硬化症、ニューロパチー等である。

- 10 この第1発明の医療用組成物の成分である「薬学的成分」とは、第1には、通常の薬剤製造に用いられる各種の担体を意味する。担体は、対象疾患の種類や薬剤の投与形態に応じて広い範囲から適宜に選択することができるが、この発明の医療用組成物は、経口的にまたは注射により投与しうる単位服用形態にあることが望ましい。特に、注射による投与の場合には、局所注入、腹腔内投与、選択的
- 15 静脈内注入、静脈注射、皮下注射、臓器灌流液注入等を採用することができる。

懸濁剤およびシロップ剤のような経口液体調製物は、水、シュクロース、ソルビトール、フラクトース等の糖類、ポリエチレングリコール等のグリコール類、ゴマ油、大豆油等の油類、アルキルパラヒドロキシベンゾエート等の防腐剤、ストロベリー・フレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を使用して製造することができる。

- 20 散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロース、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ソーダ等の崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の表面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を用いて製剤化することができる。錠剤およびカプセル剤は、投与が容易であるという点において、この発明の組成物における好ましい単位投与形態である。錠剤やカプセルを製造する際には、固体の製薬担体が用いられる。

また、注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶

液の混合物、各種の緩衝液等からなる担体を用いて製剤化することができる。また粉末状態で製剤化し、使用時に前記液体担体と混合して注射液を調製するようにしてもよい。

この発明の医療用組成物の投与量は、患者の年齢や体重、症状、投与経路等によって異なるが、ECP の血中濃度が 10nmol \sim 0.1mmol、好ましくは 5nmol \sim 0.5mmol 程度となる量を投与すればよい。

薬学的成分の第2は、ECP を細胞内に導入可能な形態とするための成分である。例えば、このポリペプチドの構造や機能を変更することなく、かつ薬理学的に許容される溶液にこのポリペプチドを混合して組成物とすることができる。このような組成物は、例えばマイクロインジェクション法により細胞内に導入する方法や、脂質（例えば、BioPORTER (Gene Therapy Systems 社、米国)、Chariot (Active Motif 社、米国) 等) を用いた細胞内導入法によって標的細胞に導入することができる。

薬学的成分の第3は、ECP をコードするポリヌクレオチドを細胞内に導入可能な形態とするための成分である。すなわち、ポリヌクレオチドを真核細胞用の発現ベクターに組み込み、このベクターを、例えば生体認識分子を提示した中空ナノ粒子、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等に組み込むようにすればよい。このような組成物は、遺伝子治療の手法により生体内の標的細胞に導入することができる。

この出願の第2の発明は、好酸球カチオン性タンパク質と細胞生物学的成分とを含有する培地組成物であって、培養細胞の生存維持、増殖および/または細胞分化を促進させるための使用することができる。

「細胞生物学的成分」とは、細胞の生存、増殖、分化等に必須の成分であって、具体的には通常の動物細胞培地を構成する成分である。具体的には、緩衝液（リン酸塩-炭酸水素ナトリウムと二酸化炭素ガスなど）、塩類、グルコース、ビタミン、アミノ酸等の有機物質、血清（ウシ胎児血清:FBS）や栄養因子（Growth Factor in Serum: GFS）等である。これらの成分と ECP とを適宜に混合することによってこの発明の培地組成物を製造することができる。各成分の含有量は通常の動物培養培地と同程度とすることができる。ECP は、細胞の種類や目的に応じて適宜

とすることができるが、培地 1ml に対して 0.001~10 μ 程度とすることができる。

「細胞」は、通常の動物細胞の対象となる細胞を用いることができるが、特に、神経細胞、骨細胞、心筋細胞、線維芽細胞等が好ましい。またこれらの細胞は、動物組織から単離した初代細胞、継代細胞、株化細胞、あるいは外来遺伝子を導入した形質転換細胞であってもよい。「培養」は、浮遊細胞の場合には浮遊培養、5 接着性細胞の場合には単層培養または3次元培養として行うことができる。また中空性ポリマー管内でのホロファイバー培養としてもよい。

この第2発明の培地組成物を用いた培養によって、培養細胞を長期間に渡って生存させ、または機能発現のために分化させることができる。このため、この組成物を用いた培養系は、細胞の生存、細胞骨格形成、増殖、分化といった細胞生物学的事象、あるいはこれらの事象を司るシグナル伝達カスケード（特に Rho キナーゼ経路）の解明に有用である。また、この組成物は、細胞を機能発現状態に分化させ、あるいは細胞を長期間に渡って生存させることができるため、有用物質の製造（バイオリアクター等）にも利用することができる。

15 さらに、この発明の培地組成物は、ECP を含有することによって、低血清や無血清であっても神経細胞等を長期間に渡って生存させることができる。このため、ECP 以外のタンパク質成分が少ない、または全くない状態で細胞機能を解析することができるため、細胞の特定機能に作用するタンパク質因子等をスクリーニングするための系としても有用である。

20 この出願の第3の発明は、細胞の生存維持、増殖および/または細胞分化の促進作用を有する、ECP 以外の新規因子を特定するためのスクリーニング方法である。すなわち、細胞に候補物質を接触させ、その細胞の生存期間あるいは分化状態を測定する。そして、この測定値が、ECP を細胞に接触させた時の測定値と同程度またはそれ以上である場合に、試験した候補物質が目的因子であると決定する
25 ことができる。細胞の生存は、例えばトリパンブルー染色法等の公知の方法で行うことができる。細胞の増殖は、一定期間の培養後の生細胞数を計測することによって行うことができる。また細胞の分化は、分化細胞に特有のマーカを対象とする免疫染色やウエスタンブロット分析、RT-PCR 法等によって行うことができる。

細胞は、ECP の接触によってその生存期間を延長させる細胞、増殖または分化を促進させる細胞であり、具体的には、神経細胞、骨細胞、心筋細胞、線維芽細胞等が好ましい。またこれらの細胞は、動物組織から単離した初代細胞、継代細胞、株化細胞、あるいは外来遺伝子を導入した形質転換細胞であってもよい。これらの細胞は、通常の動物細胞培養と同一の条件下で試験することができる。なお、細胞の生存を試験する場合には、血清や成長因子が存在しない条件下で培養することが好ましい。さらに、これらの細胞は、動物個体内にある細胞であってもよい。

「候補物質」は、例えば、未知および既知の有機または無機化合物、タンパク質、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド等である。これらの候補物質を細胞に接触させる場合には、候補物質を培養細胞の培地に添加する方法、培養細胞または動物個体内の細胞に候補物質を導入する方法（マイクロインジェクションや脂質による細胞内導入法）等を採用することができる。また、候補物質がポリヌクレオチドやオリゴヌクレオチドの場合には、その発現ベクターを公知の方法で細胞にトランスフェクションしたり、遺伝子治療の方法に準じて動物個体にウイルスベクターを感染させてもよい。

このスクリーニング方法によって特定される新規因子は、単独で、または ECP との組み合わせによって、治療用組成物や培地組成物の有効成分となりうる。

以下、実施例として、ECP の新規生理活性を確認するために行った試験研究の結果を示して、この出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

実施例

実施例 1：正常組織由来細胞株の増殖に対する ECP の効果

マウス線維芽細胞株 (BALB/c 3T3)、大動脈平滑筋細胞株 (A10)、マウス乳腺内皮細胞株 (HC-11) およびヒト臍帯血管内皮細胞株 (HUVEC) の増殖に対する ECP の効果を、10% FBS の存在下で解析した。まず、96 穴培養プレートの 10% FBS 含有 DMEM 培養液中に 500 cells/well になるように各細胞を播種した。24 時間、5% CO₂ に維持した培養庫で培養し、0 から 10 μ M の各濃度の ECP および RNaseA を添

加し、48 時間、同じ培養庫で培養を続けた。そして、3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) を添加し、各細胞の増殖率を求めた。

その結果を図 1 に示した。この図 1 から明らかなように、BALB/c 3T3 細胞は ECP の添加により、細胞増殖が促進されることが確認された。一方その他の細胞株は、ECP による増殖促進がないか、または増殖が抑制された。

実施例 2 : BALB/c 3T3 細胞増殖に対する ECP の効果

96 穴培養プレートの 10% FBS 含有 DMEM 培養液中に BALB/c 3T3 A31-K 細胞を 1000 cells/well の濃度で播種した。24 時間後、最終濃度 $1\mu\text{M}$ の ECP または RNaseA をそれぞれ培養液中に添加した。48 時間培養を続けた後に生細胞数を測定した。

結果は図 2 に示したとおりである。ECP は何れの濃度においても有意に細胞増殖を促進させた。一方、RNaseA には増殖促進効果は見られなかった。

実施例 3 : BALB/c 3T3 細胞増殖の経時変化に対する ECP の効果

96 穴培養プレートの 10% FBS 含有 DMEM 培養液中に BALB/c 3T3 細胞を 1000 cells/well の濃度で播種した。培養 24 時間後、 $1\mu\text{M}$ ECP または $1\mu\text{M}$ RNaseA をそれぞれ 1ng/ml になるように培養液中に添加した。4 日間培養を続け、24 時間ごとに生細胞数を測定した。なお、培養 2 日目に培養液の交換を行った。

結果は図 3 に示したとおりである。培養 2 日目の培地交換ののち、ECP 添加条件では細胞の増殖が著しく促進された。

実施例 4 : 低血清条件下での BALB/3T3 細胞増殖に対する ECP の効果

24 穴培養プレートの 10% FBS 含有 DMEM 培養液に、 2×10^4 cells/well になるように BALB/c 3T3 細胞を播種し培養した。24 時間後、培養細胞が安定したら、0.5% FBS を含む DMEM 培養液に培地を交換して培養を続けた。24 時間後、 $1\mu\text{M}$ の ECP および RnaseA、60pM の bFGF をそれぞれ組み合わせて培養液に添加し、さらに 48 時間培養を行った後、各条件下で培養した細胞を位相差顕微鏡 (対物レンズ $\times 20$) にて観察した。

結果は図 4 に示したとおりである。細胞は bFGF 単独で増殖したが、bFGF + ECP の条件でさらに顕著な細胞増殖効果が観察された。

実施例 5 : 低血清条件下での BALB/c 3T3 細胞骨格分子に対する ECP の効果

24 穴培養プレートに予め滅菌した直径 15mm の丸型カバーガラスを置き、0.1%

- ゼラチンを含む1×リン酸緩衝液 (PBS) を各ウェルにカバーガラスが十分浸たる程度に入れて、30 分間室温に放置し、カバーガラスをゼラチンコートした。各ウェルに 10% FBS 含有 DMEM 培養液を充填し、BALBc/ 3T3 細胞を 2×10^4 cells/well になるように播種して培養した。24 時間後、0.5% FBS 含有 DMEM 培養液に培地を交換した。さらにその 24 時間後、 $1 \mu\text{M}$ の ECP または RNaseA をそれぞれ培養液に添加した。6 時間後に BALB/c 3T3 細胞が生育したカバーガラスをウェルから取り出して、1×PBS で 2-3 回洗浄した後、カバーガラスを 4% フォルムアルデヒド (和光純薬工業社) に室温で 10 分間浸して細胞を固定した。次に、1×PBS で 2-3 回洗浄し、0.1% Triton-X100 を含む 1×PBS に 10 分間浸して細胞膜を溶解させ、1×PBS で 2-3 回再度洗浄し、0.5% BSA/PBS に浸けて室温で 30 分間放置し、この操作中の BSA によって非特異的吸着部分をブロックした。1 次抗体を含む PBS で $11 \mu\text{g/ml}$ に希釈し、細胞をこの抗体希釈液に 30 分間浸し、1 次抗体反応を行った。1 次抗体は、F-actin、vinculin および F-actin と vinculin の混合の 3 種類を用いた。
- 次に、5 分毎に新しい 1×PBS に交換・洗浄を行い、2 次抗体として RITC 結合型ヤギ抗マウス IgG 抗体 (CHEMICON 社) を $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{M}$ の FITC-phalloidin/メタノール (Molecular Probes 社) を 100nM になるように 1×PBS 中で混合し、細胞をこの抗体希釈液に 30 分間浸して反応させた。その後、5 分毎に新しい 1×PBS に交換・洗浄し、等量の 1×PBS : グリセロール溶液を挟んで前記の丸型カバーガラスをスライドガラスに落とし、共焦点レーザー顕微鏡 (MRC-1024、Bio-Rad 社) で観察した。
- 結果は図 5 に示したとおりである。ECP を加えた場合の細胞群には、多くの細胞骨格分子 (ストレスファイバー) の形成が増加 (矢印) していることが確認された。
- また、 $1 \mu\text{M}$ の ECP または RNaseA に加え、それぞれ 60pM の bFGF を添加して同様に細胞骨格形成を観察した。
- 結果は図 6 に示したとおりであり、ECP と bFGF の共存下では細胞骨格分子がより顕著に形成されることが確認された。

実施例 6 : ECP による細胞骨格形成に対する ROCK 阻害剤の効果

24 穴培養プレートで BALB/3T3 細胞および同細胞のクローン A31-11-1 細胞を 1×10^4 cells/well で播種し培養し、24 時間後に 0.5% FBS 含有 DMEM 培養液に培地を交換し、培養を続けた。そのさらに 24 時間後、 $1 \mu\text{M}$ の ECP または RNaseA とともに、 $10 \mu\text{M}$ の ROCK 阻害剤 (Y27632) を添加した。6 時間後細胞を回収し、抗体染色を行い、顕微鏡 (対物レンズ $\times 40$) で細胞骨格の形成を観察した。

結果は図 7 に示したとおりである。ROCK 阻害剤を添加することによって、ECP によるストレスファイバー形成促進が阻害されたことから、ECP による細胞骨格形成には Rho キナーゼが関与していることが確認された。

10 実施例 7 : 新生仔ラット由来の心筋細胞に対する ECP の効果

心筋培養細胞を SFM ($2 \mu\text{M}$ BrDU、100unit/ml ペニシリン、 $100 \mu\text{g/ml}$ ストレptomycin) 中で 48 時間培養して脱分化させた。その後、培養液を交換し、最終濃度 100ng/ml の ECP を添加し、さらに 24 時間後、 $1 \times \text{PBS}$ で 10 分間、3 回洗浄し、4%パラフォルムアルデヒドに 30 分間室温で浸し、細胞を固定した。そして、0.25% Triton-X100 を含む PBS に 15 分間室温で浸し、BSA 含有のブロッキングバッファーに、抗 ENH1 抗体を 1:40 の割合で、抗 α -アクチニン抗体は 1:100 の割合で添加し、 4°C で一晚浸し反応させた。次に、0.03% Triton-X100 含有 PBS で 20 分間洗浄し、これを 3 回繰り返した。ブロッキングバッファーに Cy3 標識抗マウスおよび Cy2 標識抗ウサギ IgG 抗体をそれぞれ 1:250 になるよう添加し、 4°C で 4 時間反応させた。反応後、再度 0.03% Triton-X100 含有 PBS で 20 分間洗浄し、これを 3 回繰り返して、水分を除去して、90%グリセロールを加えた。

図 8 は免疫蛍光染色の結果である。この図 8 に示したように、ECP によって心筋細胞に心肥大化作用が確認された。

実施例 8 : 新生仔ラット由来の心筋細胞の拍動数に対する ECP の効果

25 新生仔ラットから単離した心筋細胞を、実施例 7 と同様にして脱分化し、ECP (1ml 当たり 10ng 、 100ng または $1 \mu\text{g}$) を培養液に添加して、その 24 時間後に拍動数を計測した。

結果は図 9 に示したとおりである。心筋細胞拍動数が ECP 用量依存的に増加することが確認された。

さらに、この ECP の心筋細胞拍動数の増加効果に対する ROCK 阻害剤 (Y27632) の効果を試験した。Y27632 の添加量は 0、5、10 または 15 μM とし、ECP 濃度は 100ng/ml とした。

結果は図 10 に示したとおりである。ROCK 阻害剤によって、ECP による拍動数の増加が消失することから、この ECP 活性がシグナル伝達カスケードにおける Rho キナーゼ経路に依存することが確認された。

実施例 9 : 神経様 PC12 細胞の無血清条件下での細胞生存に対する ECP の効果
PC12 細胞を 96 穴培養プレートで、 1×10^4 cells/well/100 μl で一晚培養した。培地は、10% FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含有する DMEM 培養液を使用した。その後、150 μl の DMEM で 1 回洗浄し、100 μl の ECP、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含有する DMEM 培養液に培地を交換し、72 時間培養を行い、生存細胞数を CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (No. G7570 ; Promega 社) で計測した。

結果は図 11 に示したとおりである。ECP 添加によって、神経細胞の生存が維持されることが確認された。

実施例 10 : 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性に対する ECP の効果

MC3T3-E1 細胞を 24 穴培養プレート中の α -MEM 培地に播種し、ECP (最終濃度として 1ml 当たり 1ng、10ng、100ng または 1 μg)、BMP-4 (100ng/ml) または bFGF (100ng/ml) を添加した。72 時間後、細胞を 10mM Tris-HCl (pH7.2) 溶液で 2 回洗浄し、0.1% Triton-X100 含有の 10mM Tris-HCl (pH7.2) 溶液で溶解した。次に、前記細胞溶解液を 15 秒間、超音波処理して細胞を破碎し、この細胞破碎液 100 μl と 0.1M アミノメチルプロパノールで pH10.5 に調整した基質溶液 (4mg/ml p-nitrophenyl phosphate および 2mM MgCl_2) 100 μl を混合し、37°C で 30 分間反応させた。この反応を 0.5M の NaOH にて停止させ、410nm の吸光度を測定した。得られた値を細胞破碎液の総タンパク質量で割り、比活性を算出した。

結果は図 12 に示したとおりである。コントロール置を 100%として各添加成分の効果を示した。ECP を 1ng/ml 添加した場合、骨誘導因子の一種である BMP-4 と同等以上の ALP 活性が得られた。

産業上の利用可能性

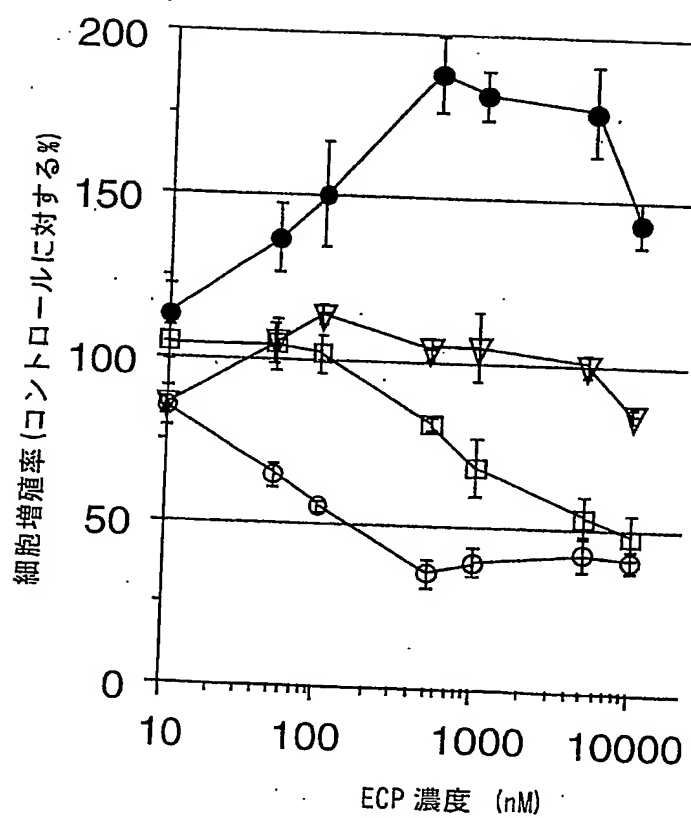
以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、ECP の新規生理活性に基づく治療用組成物が提供され、細胞の生存、増殖および／または分化の異常を
5 原因とする心臓疾患、骨疾患および神経変性疾患等の治療に新たな途が拓かれる。また、培養細胞の生存期間の延長、増殖促進および／または分化促進のための培地組成物が提供される。さらには、細胞の生存、増殖および／または分化を促進する新規因子を特定するための手段が提供され、さらに有効な治療用組成物の開発が可能となる。

請求の範囲

1. 細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化の障害を原因とする疾患に対する治療用組成物であって、好酸球カチオン性タンパク質と薬理学的成分とを含有することを特徴とする組成物。
5
2. 細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化の障害を原因とする疾患が、心臓疾患、骨疾患または、神経変性疾患である請求項1の組成物。
3. 細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化を促進する培地組成物であって、好酸球カチオン性タンパク質と細胞生物学的成分とを含有する組成物。
- 10 4. 細胞の生存維持、増殖および／または細胞分化の障害を原因とする疾患に対する治療用組成物の有効成分物質をスクリーニングする方法であって、細胞に候補物質を接触させ、好酸球カチオン性タンパク質と同程度またはそれ以上に細胞の生存維持および／または細胞分化を促進させる物質を目的物質として特定することを特徴とするスクリーニング方法。
- 15 5. 細胞が、神経細胞、骨細胞、心筋細胞または線維芽細胞である請求項4のスクリーニング方法。

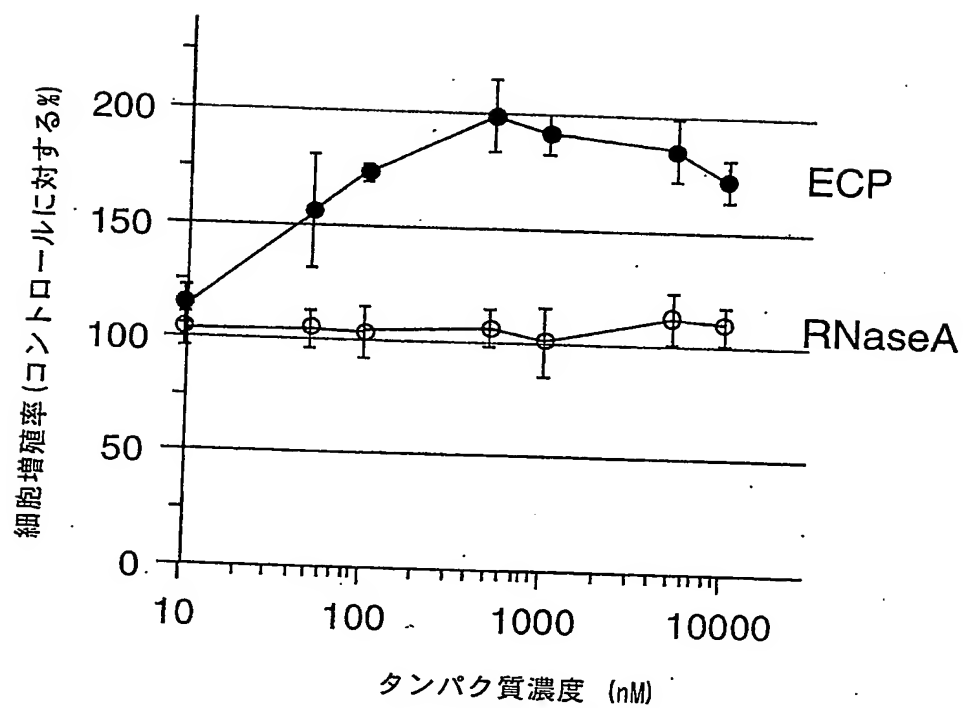
1/12

図 1



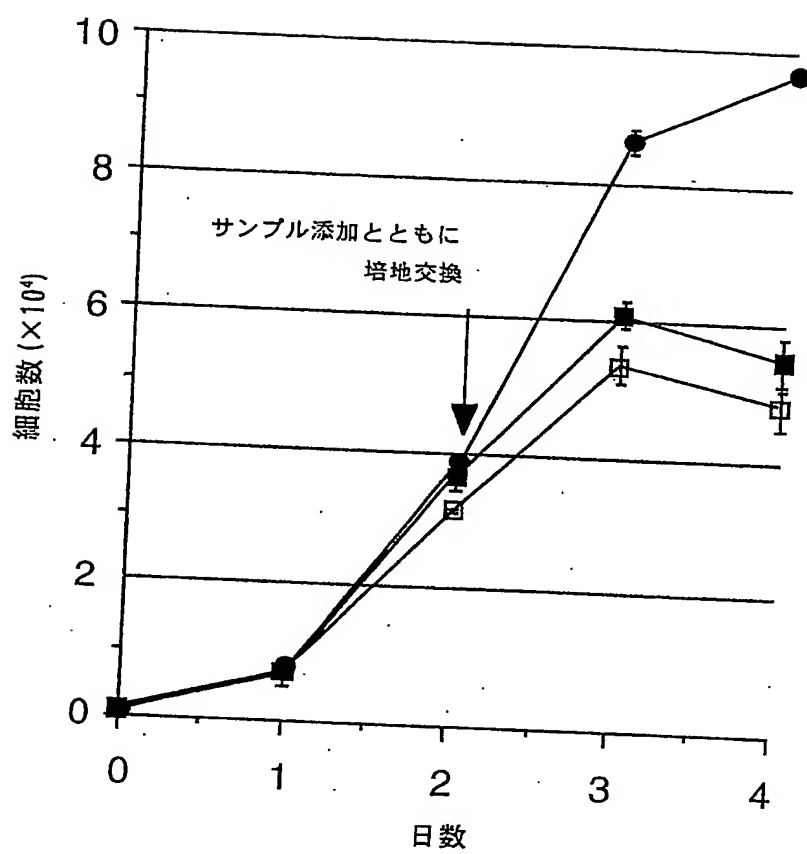
2/12

図 2



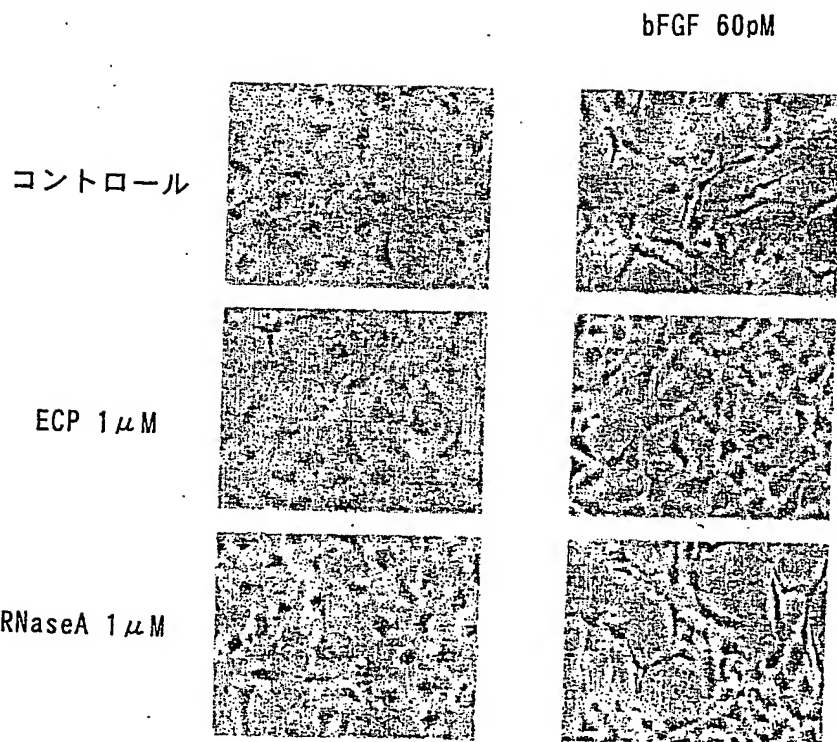
3/12

図 3



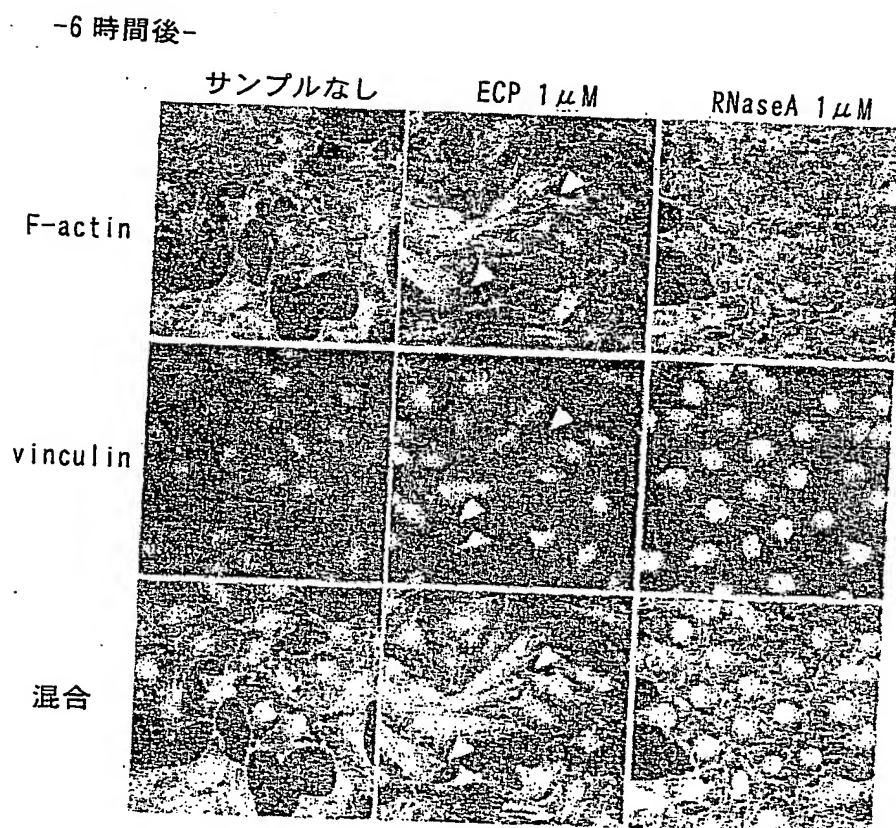
4/12

図 4



5/12

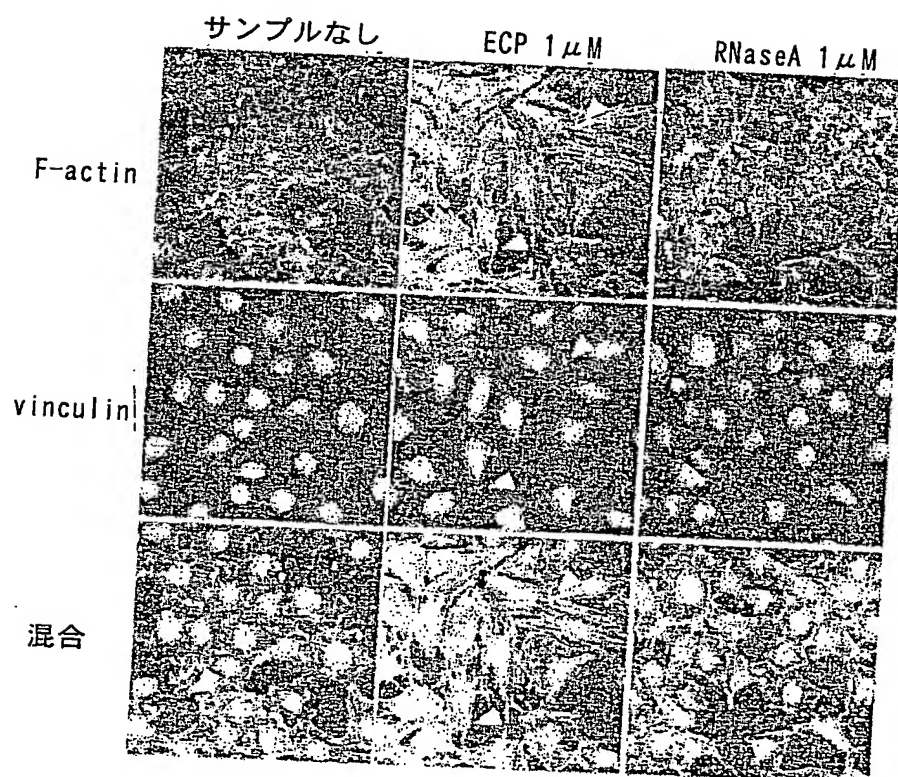
図 5



6/12

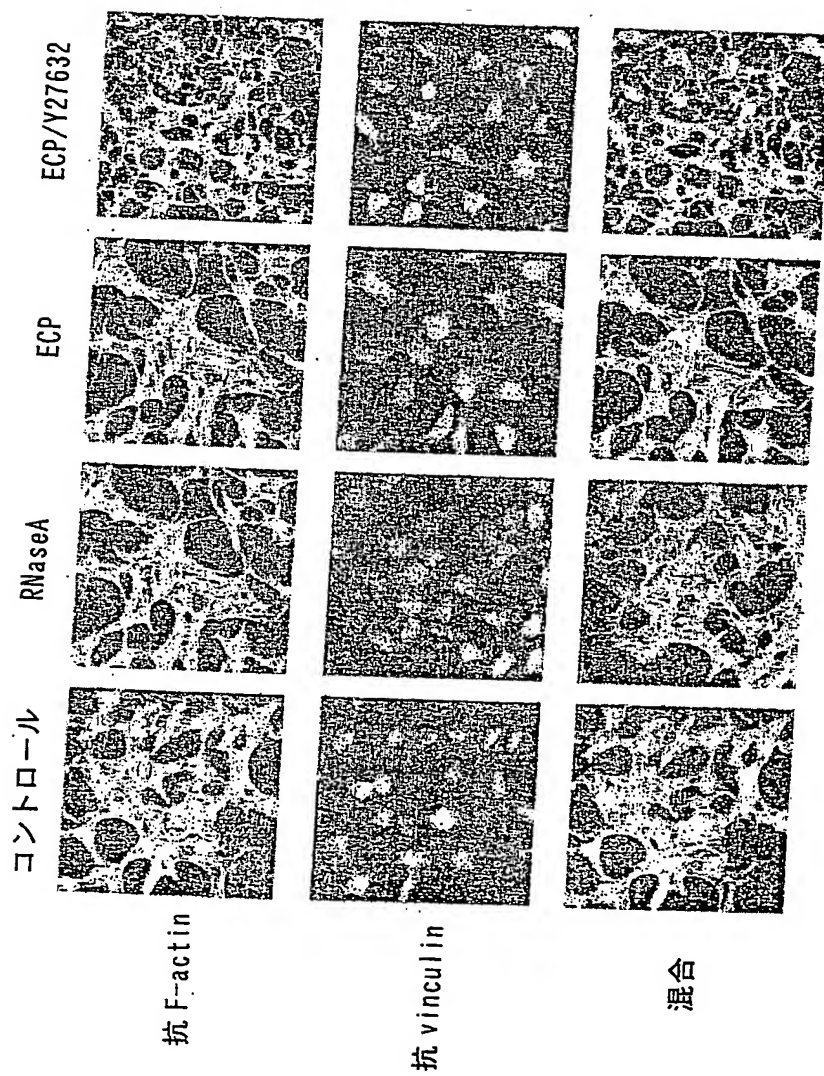
図 6

-6 時間後-



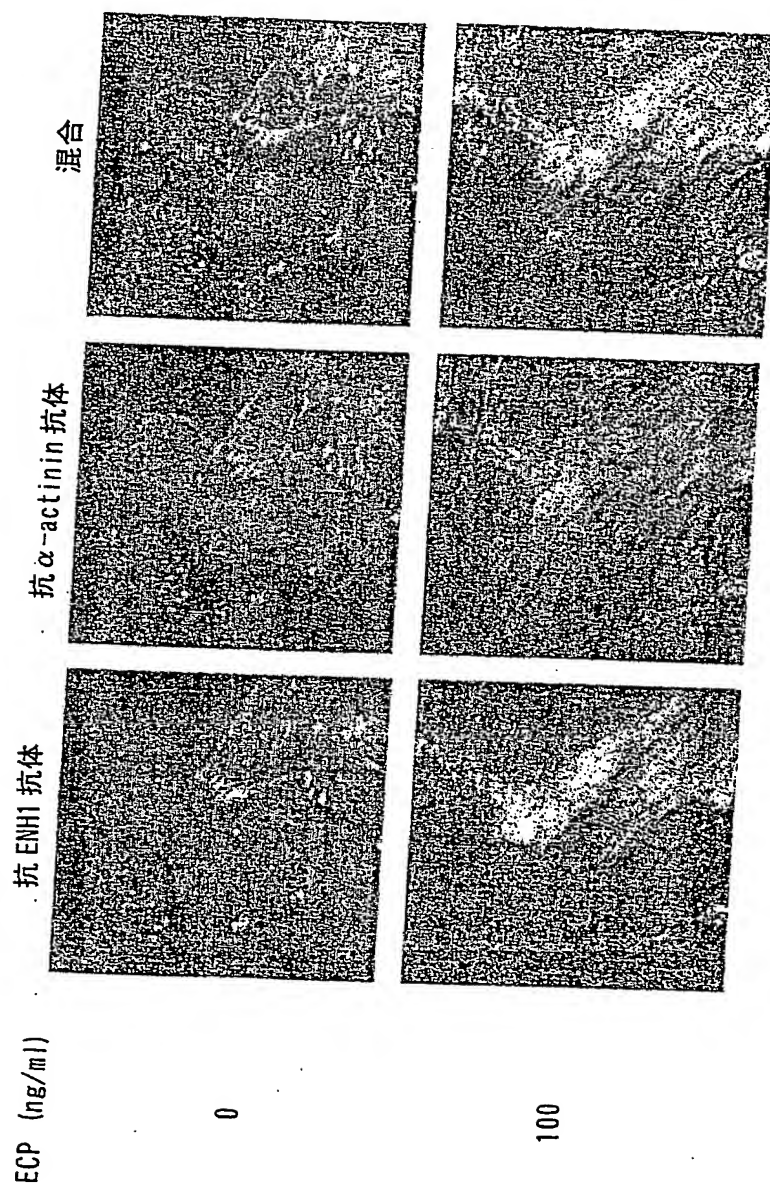
7/12

図 7



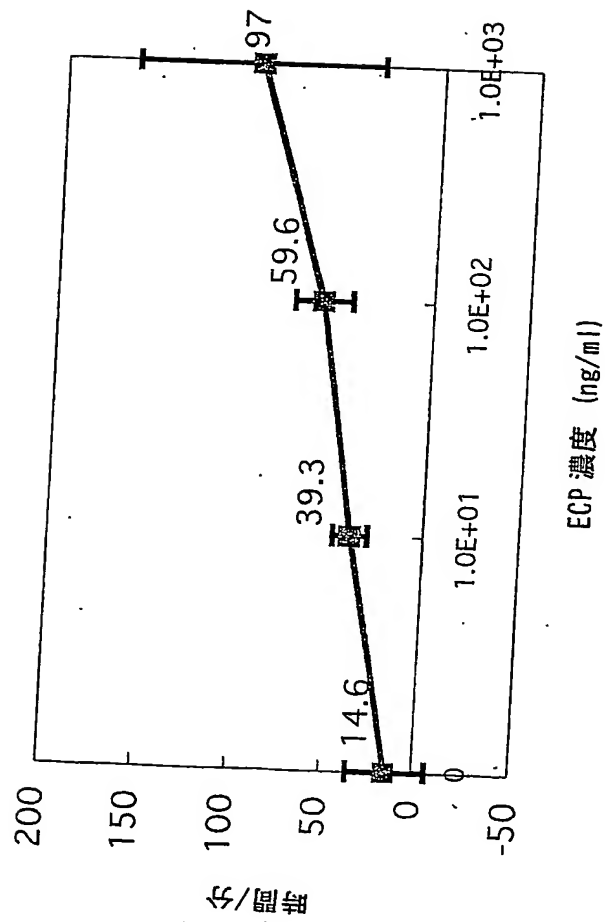
8/12

图 8



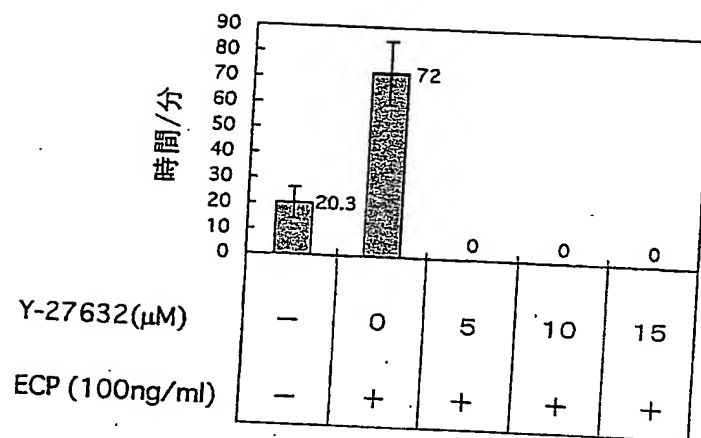
9/12

図 9



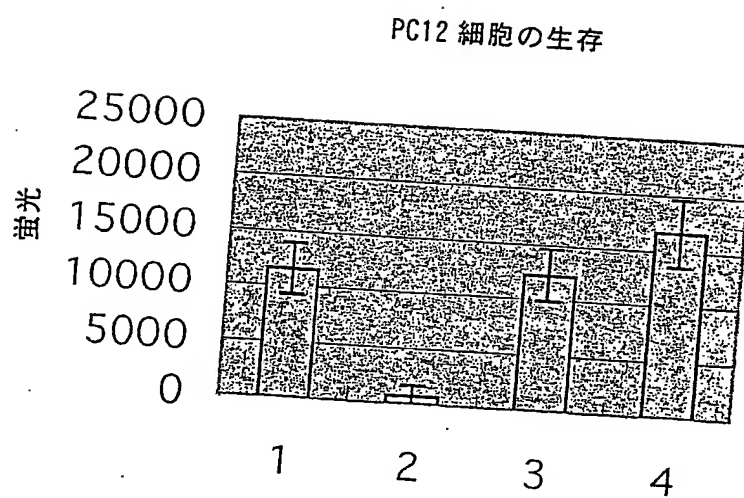
10/12

図 10



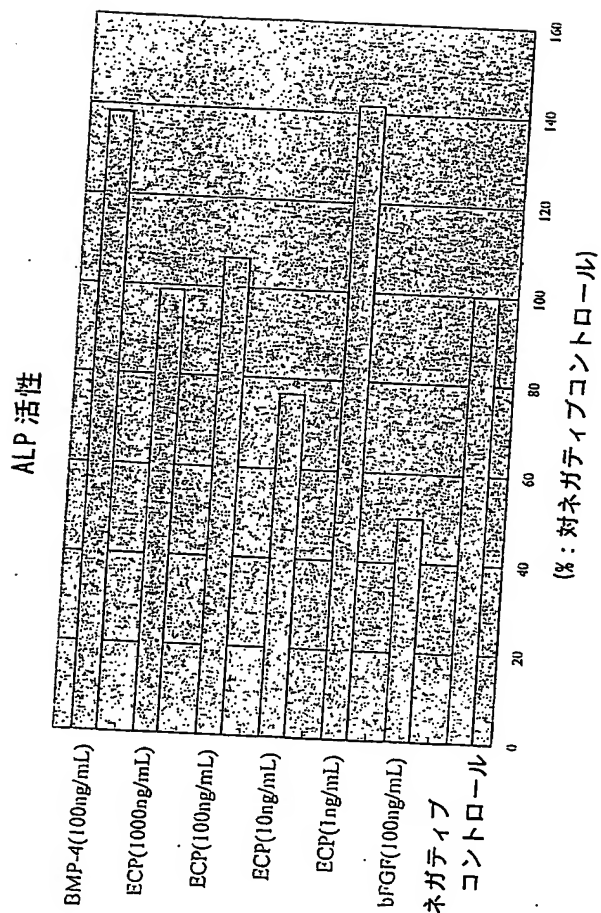
11/12

図 1 1



12/12

図 1 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/12680

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/17, 45/00, A61P9/00, 19/08, 25/00, 43/00, C12Q1/02,
G01N33/50, 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/17, 45/00, A61P9/00, 19/08, 25/00, 43/00, C12Q1/02,
G01N33/50, 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98/17794 A1 (Incyte Pharmaceuticals, Inc.), 30 April, 1998 (30.04.98), & JP 2002-500506 A & EP 937144 A1 & US 5728820 A	1-5
A	WO 01/85766 A1 (Innoventus Project AB.), 15 November, 2001 (15.11.01), & JP 2003-532402 A & EP 1305335 A2	1-5
A	WO 99/01152 A1 (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES), 14 January, 1999 (14.01.99), & US 6426070 B1.	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 December, 2003 (24.12.03)

Date of mailing of the international search report
20 January, 2004 (20.01.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/12680

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 502718 A1 (Pioneer Hi-Bred International, Inc.), 09 September, 1992 (09.09.92), & JP 06-228190 A	1-5
A	JP 5-111382 A (Institute of Cytosignal Research, Inc.), 07 May, 1993 (07.05.93), (Family: none)	1-5
A	Hernnaes, Johan, et al., Eosinophil cationic protein alters proteoglycan metabolism in human lung fibroblast cultures, European Journal of Cell Biology, 1992, Vol.59, No.2, p. 352-63	1-5
A	Patella, Vincenzo et al., Eosinophil granule proteins are selective activators of human heart mast cells., International Archives of Allergy and Immunology, 1997, Vol.113(1-3), pages 200 to 202	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12680

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions according to claims 1 to 3 relate to a therapeutic composition for diseases caused by failures in the survival, proliferation and/or differentiation of cells which contains eosinophil cationic protein and a pharmaceutical component or a cell biological component or a medium composition for promoting the survival, proliferation and/or differentiation of cells. In contrast, the inventions according to claims 4 and 5 relate to a method of screening an active substance for a therapeutic composition for diseases caused by failures in the survival, proliferation and/or differentiation of cells which is a screening method characterized by comprising contacting candidate compounds with cells and (continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12680

(Continuation of Box No. II)

specifying as the target substance a substance capable of promoting cell survival and/or cell differentiation at a level comparable or superior to ETC.

Although the inventions according to claims 1 to 3 relate to a composition with the use of the physiological activities of the eosinophil cationic protein of promoting the survival and differentiation of animal cells, the inventions according to claims 4 and 5 relate to a method of screening an active substance in a therapeutic composition for diseases caused by failures in the proliferation and/or differentiation which comprises contacting cells with candidate compounds and, therefore, has no relevancy to the physiological activities of the eosinophil cationic protein of promoting the survival and differentiation of animal cells. Since there is no matter common to these groups of inventions seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence in PCT Rule 13.2, no technical relevancy can be found between these groups of inventions different from each other in the meaning within PCT Rule 13.

Such being the case, it does not appear that there is a technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. Therefore, these two groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/12680

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.¹ A61K38/17, 45/00, A61P9/00, 19/08, 25/00, 43/00,
C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.¹ A61K38/17, 45/00, A61P9/00, 19/08, 25/00, 43/00,
C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 98/17794 A1 (インサイト・ファーマスーティカルズ・インコーポレイテッド), 1998. 04. 30 & JP 2002-500506 A & EP 937144 A1 & US 5728820 A	1-5
A	WO 01/85766 A1 (イノヴェンタス・プロジェクト・アクチボラゲット), 2001. 11. 15 & JP 2003-532402 A & EP 1305335 A2	1-5
A	WO 99/01152 A1 (THE GOVERNMENT OF THE UNITED	1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 12. 03

国際調査報告の発送日

20. 1. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 のぶよ



4C

9454

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	STATES OF AMERICA, represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES), 1999. 01. 14 & US 6426070 B1	
A	EP 502718 A1 (パイオニア ハイブレッド インター ナショナル インコーポレイテッド), 1992. 09. 09 & JP 06-228190 A	1-5
A	JP 5-111382 A (株式会社サイトシグナル研究所), 1993. 05. 07 (ファミリーなし)	1-5
A	Hernnaes, Johan, et al., Eosinophil cationic protein alters proteoglycan metabolism in human lung fibroblast cultures, European Journal of Cell Biology, 1992, Vol.59, No.2, p.352- 63	1-5
A	Patella, Vincenzo, et al., Eosinophil granule proteins are selective activators of human heart mast cells, International Archives of Allergy and Immunology, 1997, Vol.113(1-3), p.200-202	1-5

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)
法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項1-3に係る発明は、好酸球カチオン性蛋白質と薬学的成分又は細胞生物学的成分とを含有する、細胞の生存維持、増殖および/または細胞分化の障害を原因とする疾患に対する治療用組成物、又は、細胞の生存維持、増殖および/または細胞分化を促進する培地であるのに対し、請求項4、5に係る発明は、細胞の生存維持、増殖および/または細胞分化の障害を原因とする疾患に対する治療用組成物の有効物質をスクリーニングする方法であって、細胞に候補物質を接触させ、ETCと同程度またはそれ以上に細胞の生存維持および/または細胞分化を促進させる物質を目的物質として特定することを特徴とするスクリーニング法である。

(特別ページに続く)

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

(第Ⅱ欄の続き)

しかしながら、請求項1-3に係る発明は、好酸球カチオン性蛋白質が、動物細胞の生存維持や分化促進といった生理活性を有することを利用した組成物に係る発明であるが、請求項4、5に係る発明は、細胞に候補物質を接触させ、増殖および/または細胞分化の障害を原因とする疾患に対する治療用組成物の有効物質をスクリーニングする方法であって、好酸球カチオン性蛋白質が、動物細胞の生存維持や分化促進といった生理活性を有することとは何の関係もない方法であって、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる共通の事項が存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。